

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



**Vliv Spiruliny platensis na endoteliální expresi eNOS
u myší.**

**Spirulina Platensis effects on endothelial expression
of eNOS in mice.**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce

Hradec Králové 2012

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Beata Rusnoková

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.
V Hradci Králové dne

.....
(podpis)

Děkuji vedoucímu této diplomové práce Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD za odborné vedení, podnětné připomínky a veškerý čas, který tomu věnoval.

Abstrakt

Beata Rusnoková

Vliv podávání *Spiruliny platensis* na endoteliální expresi eNOS u myší.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Sledovali jsme endoteliální expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) v aortě apoE-deficitních myší po 8 týdenním podávání *Spiruliny platensis*. K hodnocení exprese eNOS byly použity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci stereologické metody.

Metody: K experimentu jsme použili samce myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}), které jsme rozdělili do dvou skupin. Kontrolní skupině byla podávána aterogenní dieta s obsahem 1 % cholesterolu po dobu 8 týdnů. Ve *Spirulina platensis* skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou s přídavkem 40 mg *Spiruliny* denně. Provedli jsme biologickou analýzu vzorků krve. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm. Pro detekci exprese eNOS byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky: Biochemická analýza neprokázala signifikantní změny v hladinách celkového cholesterolu u kontrolovaných myší ve srovnání se skupinou, které byla podávána *Spirulina*. Výrazná exprese eNOS byla detekována u všech myší v experimentu. U obou skupin byla exprese velmi podobná a nebyly mezi nimi patrné významné změny z hlediska intenzity. Stereologická analýza potvrdila, že podávání *Spiruliny platensis* neovlivnilo endoteliální expresi eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou.

Závěr: Podávání spiruliny nevedlo k signifikantním změnám hladin cholesterolu ve srovnání s neléčenou skupinou. *Spirulina platensis* není schopna ovlivnit endoteliální expresi eNOS bez případného vlivu na hladiny cholesterolu.

Abstract

Beata Rusnoková

Spirulina platensis effects on endothelial expression of in mice

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: We observed the endothelial expression of eNOS in aorta of ApoE-deficient mice after 8 weeks long administration of *Spirulina platensis*. The expression was assessed by using immunohistochemical methods and quantified by means of stereological methods.

Methods: In the experiment, we used C57BL/6J male mice with deficiency of apolipoprotein E (apoE^{-/-}) that were divided into two groups. The control group was fed by atherogenic diet with 1 % cholesterol for 8 weeks. Mice from *Spirulina platensis* group was fed by the same atherogenic diet with the addition of 40 mg *Spirulina platensis*. We performed a biochemical analysis of blood. The immunohistochemical analysis was performed in a 1 cm aortic sinus and the aortic arch. A series of cross sections with a thickness of 7 µm were to evaluate. The detection of expression of eNOS was performed by Envision methods by means of DAB.

Results: The biochemical analysis did not show significant changes in total cholesterol levels in the control mice compared with the group administrated by *Spirulina*. The marked expression was observed in all mice in the experiment. There were no significant changes in the intensity of expression between them. The stereological analysis confirmed that administration of *Spirulina platensis* did not affect the expression of eNOS compared with the control group.

Conclusions: *Spirulina platensis* administration did not lead to significant changes in comparison with the control group. *Spirulina platensis* cannot affect the endothelial expression of eNOS without possible effects on cholesterol levels.

1	Úvod	8
2	MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	9
2.1	Obecná stavba cév	9
2.2	Kapiláry	10
2.3	Artérie	11
2.4	Vény	12
3	ATEROSKLERÓZA	14
3.1	Epidemiologie	14
3.2	Rizikové faktory	15
3.3	Patogeneze aterosklerózy	17
3.3.1	Úloha lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy	17
3.3.2	Úloha zánětu v patogenezi aterosklerózy	19
3.3.3	Úloha buněk hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy	21
3.3.4	Základní formy aterosklerózy z patologického hlediska	22
4	ZVÍŘECÍ MODEL Y PRO VÝZKUM ATEROSKLERÓZY	25
4.1	Myš jako model pro výzkum aterosklerózy	25
4.2	Apolipoprotein E	26
5	eNOS	28
5.1	eNOS a ateroskleróza	28
6	SPIRULINA PLATENSIS	30
6.1	Živiny ve spirulině	31
6.2	Vlivy spiruliny	32
7	CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE	33
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
8.1	Zvířata a předepsaná dieta	34
8.2	Biochemická analýza	34
8.3	Imunohistochemie	34
8.3.1	Primární protilátky	35
8.3.2	Sekundární protilátky	35
8.3.3	Detekční systémy	35
8.3.4	Pracovní postup - <i>EnVision systém</i>	35
9	VÝSLEDKY	38
9.1	Biochemická analýza	38
9.1.1	Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu	38

9.2	Stereologická analýza exprese eNOS v aortě myší.....	43
10	DISKUZE.....	44
11	ZÁVĚR	46
12	SEZNAM ZKRATEK.....	47
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50

1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) zaujímají na celém světě první místo v příčinách mortality. Do této skupiny onemocnění patří převážně ateroskleróza, ischemická choroba srdeční a její jednotlivé formy. Z toho důvodu správný výběr terapie je velmi důležitý pro jejich závažnost a převážně chronický průběh (1).

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je porucha srdeční funkce, která vzniká na podkladě nedostatečného krevního zásobení myokardu při stenozujících nebo obliterujících změnách věnčitých tepen. Hlavními projevy ICHS jsou bolestivé (algické) formy jako angina pectoris a akutní infarkt myokardu. Jiné projevy mohou být např. němá ICHS (bez příznaků), chronické srdeční selhání, arytmie, náhlá koronární smrt bez předcházející bolesti či infarkt myokardu označované jako nebolestivé formy (2).

Podkladem jsou patologické změny v koronárních tepnách, nejčastěji způsobené aterosklerózou, která zužuje a uzavírá cévy, a tak snižuje průtok krve a přísun kyslíku. Další příčiny plynou ze spasmů koronárních tepen, embolie nebo arteriální hypertenze či z onemocnění malých cév (3).

Pojem ateroskleróza pochází z řečtiny (atharé = kaše, skléros = tvrdý) a jedná se o onemocnění, během kterého dochází ve stěně tepen k ukládání krevních lipidů, což následně způsobí zánětlivou reakci. Charakteristickým rysem pro průběh tohoto onemocnění je vznik aterosklerotických platů, jenž zužují postižené tepny a mohou je i zcela uzavřít.

Ovlivnitelné a neovlivnitelné rizikové faktory napomáhají vzniku aterosklerózy. Terapie zahrnuje režimová opatření a farmakologickou léčbu především hypolipidemiky, antihypertenzivy a antikoagulancii. Je podstatné nacházet v této oblasti stále nové postupy léčby a posilovat důslednou primární prevenci těchto onemocnění (4).

2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

2.1 Obecná stavba cév

Krevní cévy vyvíjejí spojitý systém. Rozlišujeme je podle typu a velikosti. Cévní stěnu tvoří obvykle tři vrstvy neboli tuniky (z latinského tunika-plášť) (viz. obr. č. 1) a vystýlá je endotel (5).

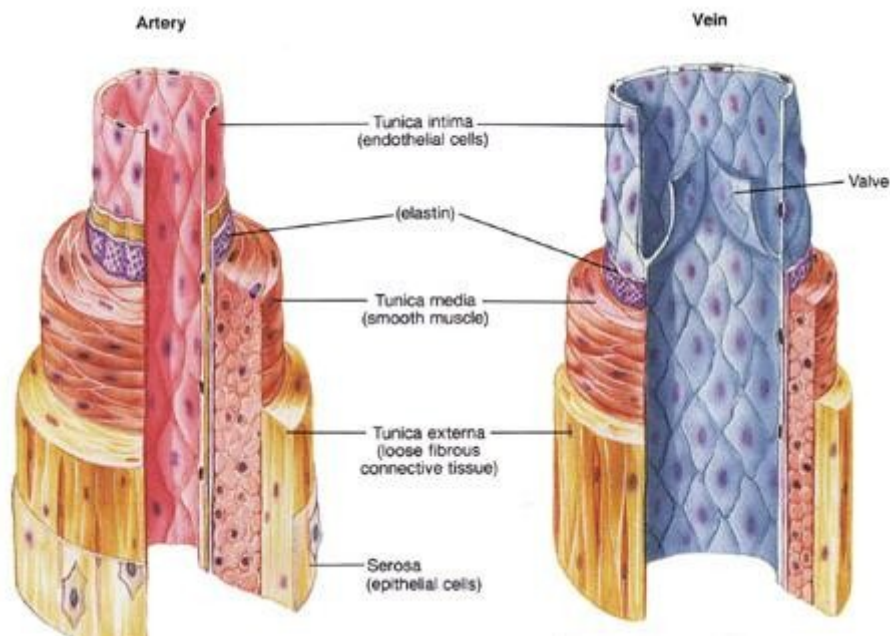
Tunika

Tunika intima – nejvnitřnější vrstva ohraničující lumen cévy. Je složena z jednovrstevného dlaždicového epitelu a subendotelové vazivové tkáně. V artériích se odděluje od střední vrstvy cévy fenestrovanou vrstvou elastinu (membrana elastica interna).

Tunika media – střední vrstva cévní stěny. Je bohatá na retikulární vlákna. Skládá se z koncentricky uložených vrstev hladké svaloviny a kolagenním vazivem typu III. Mezi hladkými svalovými buňkami se vyskytují elastické a kolagenní vlákna a proteoglykany. Ve větších artériích je mezi tunika media a tunika adventitia membrána elastica externa.

Tunika adventitia – formuje vrstvu na okraji cév. Obsahuje podélně uložená kolagenní vlákna typu I a elastická vlákna, upevňující cévu ke tkáni. V žilách je nejsilnější vrstvou. Ve velkých cévách se vyskytují malé krevní cévy (vasa vasorum), vyživující cévní stěnu v oblasti medie a adventitie (5, 6).

Obrázek č. 1: Stavba krevní cévy: Cévní stěna se skládá ze 3 hlavních vrstev, *tunica adventia*, *tunica intima* a *tunica media* (7).



http://kardiosystem.websnadno.cz/rozdil_mezi_veno.jpg&w (23. 04.2012).

2.2 Kapiláry

Kapiláry (vlásečnice) jsou nejmenší cévy. Mají malý průsvit v průměru 7, až 9 um. Vytváří systém kapilárního řečiště. Jsou složeny z jednovrstevného plochého epitelu (endotelu) mezenchymálního původu ohraničeného tenkou bazální laminou. Endotelové buňky jsou stočené do trubice a tím uzavírají cylindrický tvar. Jsou hlavní stavební jednotkou struktury kapilár. Endotelové buňky mají protáhlý tvar ve směru krevního proudu a u jádra se vyklenují do lumen. Obsahují velké množství mikrofilament, to souvisí s kontraktilitou endotelových buněk. Endotelie jsou vzájemně spojeny prostřednictvím zonulae occludentes s dezmosony a nexy. Podél kapilár a malých venul jsou rozloženy adventiciální buňky neboli pericyty (z řeckého peri, kolem a kytos). Pericyty jsou mezenchymové kmenové buňky s dlouhými výběžky. Mají schopnost kontrakce a transformace v jiné buňky (5,6).

Kapiláry rozlišujeme do čtyř skupin podle struktury jejich stěny a přítomnosti či absenci bazální laminy.

Somatické kapiláry (souvislé) bez fenestrací v endotelu s buňkami těsně přilehajícími. Vyskytují se ve všech typech svalů, vazivu, mozku, periferních orgánech a nervové tkáni. Složené ze souvislé endotelové vrstvy a bazální membrány. Jejich výstelka je hladká bez pórů.

Viscerální kapiláry (fenestrované) obsahují souvislou výstelku, ale v endotelových buňkách se objevují rozsáhlé fenestrace. Fenestrace jsou otvory, jenž jsou uzavřeny tenkou přepážkou (diafragmou). Objevují se v ledvinách, střevech a endokrinních žlázách, kde je potřebná rychlá výměna látek mezi krví a tkáněmi.

Fenestrované kapiláry bez diafragmat. jsou charakteristické pro ledvinná tělíska.

Sinusoidní kapiláry mají neobvykle rozšířený průměr, klikatý průběh a zpomalují průtok krve. Vyskytují se četné fenestrace bez diafragmat a postrádají souvislou bazální laminu. Sinusoidy se nacházejí v játrech, slezině a kostní dřeni.

Kapiláry navzájem propojují artérie a větvy, vytvářející bohaté sítě. Metarterioly jsou malé cévy obložené diskontinuální vrstvou hladkého svalstva. Stah metarteriol se podílí na regulaci oběhu v kapilárách, ale zcela ho neblokuje. Prekapilární sfinkter (v místě, kde kapiláry z metarterioly odstupují) průtok krve může zcela uzavřít (5,6).

2.3 Artérie

Artérie doručují krev do tkání. Ve svých konečných úsecích regulují průtok krve. Jejich stěnu vystýlá hlavně tunica media, jenž je mnohem silnější než stěna u vén. Charakteristickým znakem je přítomnost membrana elastica interna a externa. Rozlišujeme je dle jejich velikosti a funkce na arterioly, svalové artérie středního a velkého typu, velké artérie elastického typu (5).

Tabulka 1: Klasifikace arterií a srovnání (5, 6).

Typ arterie	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Velké elastické (např. aorta).	Silná, lumen vystýlá endotel (jednovrstevný dlaždicovitý epitel).	Velké množství koncentrických elastických vláken a mezi nimi hladkosvalové buňky.	Tenká, obsahuje kolagenní a elastická vlákna.
Střední, svalové (např. arteria brachialis, arteria mesenterica superior)	Méně výrazná, lamina elastica interna tvoří hranici mezi intimou a medií.	Silná, tvoří ji více vrstev hladké svaloviny (až 40). Podíl elastinů a proteoglykanů je závislý na velikosti arterie.	Tenká, obsahuje kolagenní a elastická vlákna.
Arterioly (malé cévy s průsvitem 0,1 – 0,5 mm)	Typický endotel, <i>lamina elastica interna</i> může chybět.	1 – 3 vrstvy hladkosvalových buněk, <i>lamina elastica externa</i> chybí.	Velmi tenká, složena z kolagenních vláken.
Metarterioly (malé větve arterioly, jejich stah řídí průtok krve kapilárami pomocí nekapilárních sfinkterů)	Typický endotel, není subendotelová vazivová tkáň ani <i>membrana elastica interna</i> .	Jedna nesouvislá vrstva hladké svaloviny.	Nesouvislá vrstva řídkého vaziva, kterou nelze odlišit od medie.

2.4 Vény

Vény (žíly) navracejí krev do srdce pomocí longitudinálně uloženého hladkého svalstva a vyvinutých chlopní, ty se podílejí na udržení jednosměrného toku krve. Nachází se v nich neustále 70% celkového objemu krve, je to vlastně rezervoár krve. Stěna vén je tenčí než u artérií, ale jejich průsvit je větší. Tuniku intimu mají výrazně tenkou, jen u velkých vén se vyskytuje silnější. Tunica media je slaběji vyvinutá než

u artérií. Tunica adventitia je výrazně vyvinutá s množstvím kolagenních a elastických vláken. Chlopně vén jsou složeny z fibroelastické vazivové tkáně, kterou oboustranně kryje endotel. Podobně jako u artérií je dělíme na venuly a vény malého, středního a velkého typu (5,6).

Tabulka 2: Klasifikace vén a srovnání (5).

Typ vény	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Velké vény (např. vena cava superior a inferior)	Dobře vyvinutá se silnou vrstvou subendotelové tkáně. Její výběžky do lumina se nazývají chlopně.	Několikavrstevná, obsahující retikulární a kolagenní vlákna, méně elastických.	Silná, obsahuje hlavně kolagen a logitudální svazky hladké svaloviny, které ji zesilují.
Malé a střední vény (např. vena portae)	Typický endotel, méně chlopní, membrána elastica interna není.	Tenká obsahující kolagenní a elastinová vlákna.	Relativně silná, obsahuje hlavně kolagen nežli svalovinu.
Venuly (průměr 0,2 - 1 mm)	Typický endotel bez chlopní.	Velmi tenká.	Je nejsilnější, složená hlavně z kolagenu.

3 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza a její rizikové faktory patří mezi jeden z nejvýznamnějších zdravotních problémů západní civilizace. Pohled na aterosklerózu se po dlouhá léta měnil. Pohlíželo se na ni, jako na mechanický děj charakterizovaný prostým hromaděním tuků (inkrustací kalcium). V současné době je vnímána jako chronický imunitně zánětlivý proces postihující velké a středně velké tepny svalového a elastického charakteru, jako odpověď na poškození intimy (4).

Ateroskleróza je onemocnění, které v nejširším pohledu lze určit jako děj postihující tepennou stěnu. Následuje zužování průsvitu tepny, který se může postupem času zcela uzavřít. Příčinou je dysfunkce endotelu a následná kumulace krevních lipidů, cholesterolu, fibrózní tkáně a kalcia ve stěně tepen vyvolávající zánětlivou reakci za účasti řady zánětlivých buněk- především monocytů, z nich vznikají makrofágy, dále lymfocyty aktivované endotelie a buňky hladkého svalstva, vytvářející zánětlivé mediátory. Tvoří se aterosklerotické pláty, zužují postižené tepny, vznikají krevní sraženiny na jejich povrchu při erozi nebo ruptuře. Proces, který začíná tvorbou tukových proužků ve stěně tepny, podléhající vazivové přeměně s následným ukládáním solí (převážně vápníků). Tukové proužky vznikají nahromaděním pěnových buněk, které jsou podkladem prvních makroskopických projevů aterosklerózy. Pěnovým buňkám se říká makrofágy a jsou naplněny tukovými kapénkami. Důsledkem toho dojde k úplnému uzávěru tepny vyživující tkáně a orgány. Následně se dostaví jejich poruchy, což může vést k úplnému přerušení výživy a tkáně většinou odumírají. Běžnější podobou aterosklerotického procesu je pouhé zúžení a neuzavření příslušné tepny, která představuje v oblasti srdce angina pectoris, projevující se bolestmi na hrudi vznikající při větším zatížení organismu. Postižení tepenného řečiště dolních končetin a pánve se projevuje bolestmi na lýtkách při chůzi (4,8,9).

3.1 Epidemiologie

V průmyslově rozvinutých zemích jsou kardiovaskulární choroby hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti. Většina z nich je způsobená aterosklerózou. Mezi její klinické projevy patří např. ischemická choroba srdeční, projevující se jako akutní koronární syndrom (tj. infarkt myokardu a nestabilní angina pectoris), popř. stabilní

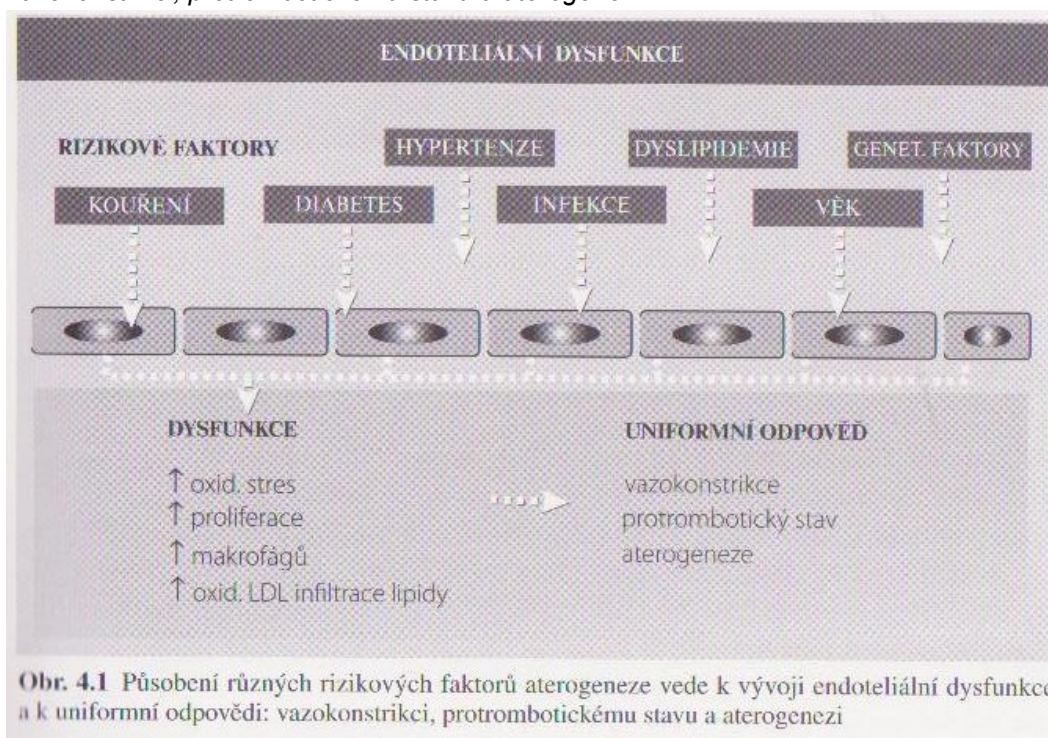
angina pectoris, městnává srdeční slabost nebo různé poruchy srdečního rytmu, choroba dolních končetin, cévní mozková příhoda a jejich komplikace (1).

3.2 Rizikové faktory

Ke vzniku a rozvoji aterosklerózy napomáhají tzv. rizikové faktory, které vedou k vývoji endoteliální dysfunkce (viz. obr. č 2). Lze je definovat následujícími atributy:

- a) mohou přispívat ke tvorbě aterosklerózy,
- b) podporují kumulaci lipidů v cévní stěně,
- c) potencují vznik trombózy,
- d) mohou urychlit projevy cévní nestability a insuficience (10).

Obrázek č. 2: působení různých rizikových faktorů aterogeneze (9). *Působení různých rizikových faktorů aterogeneze vede k vývoji endoteliální dysfunkce a k uniformní odpovědi: vazokonstrikci, protrombotickému stavu a aterogenezi.*



Rizikový faktor je významný ukazatel k později se manifestující chorobě, aniž by musel být její příčinou. Nejobvyklejší dělení rizikových faktorů aterosklerózy je na neovlivnitelné a ovlivnitelné.

Neovlivnitelné faktory:

- Věk (riziko stoupá u mužů po 45. a u žen po 55. roce).
- Genetické faktory, Rodinná anamnéza předčasné manifestace aterosklerózy (u rodičů nebo sourozenců mužského pohlaví před 55. a u ženy před 65. rokem života).
- Pohlaví (muži mají výrazně větší riziko než ženy do menopauzy, po menopauze bez substituční léčby estrogeny se riziko u žen zvyšuje. Příčinou je projektivní efekt estrogenů, který souvisí s vyššími koncentracemi HDL-cholesterolu)

Ovlivnitelné faktory:

- Dyslipidémie (celkový cholesterol 5mmol/l, LDL 3mmol/l, HDL 1mmol/l).
- Kouření cigaret (s nižším obsahem nikotinu se riziko nesnižuje, z hlediska sekundární prevence ICHS, po zanechání kouření se riziko další koronární příhody snižuje po relativně krátké době prakticky na úroveň nekuřáka).
- Arteriální hypertenze (zejména ve spojitosti s hypertrofií levé komory).
- Diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance.
- Obezita-zejména centrálního typu (BMI 30kg/m², vyšší očekávaná délka života je při BMI rozmezí 20-25).
- Metabolický syndrom (kombinace hyperlipoproteinémie, inzulinové rezistence, (DM 2.typu), hypertenze a obezity centrálního typu, nazývaná plurimetabolickým syndromem).
- Nedostatek tělesné aktivity (nedostatek cvičení a sedavý styl života).
- Trombogenní rizikové faktory (vysoká hladina fibrinogenu v séru je nezávislým rizikovým faktorem ICHS).
- Hyperhomocysteinémie-zatím není potvrzeno, že její snížení zlepšuje prognózu. Homocystein je neesenciální aminokyselina, která se podílí na metabolismu methioninu (4,8).

Kombinací několik rizikových faktorů současně se jejich efekt násobí. Navzájem se ovlivňují a zvyšují možnost vzniku a rozvoje aterosklerózy. Soubor

těchto určitých stavů se nazývá metabolický syndrom inzulinové rezistence, který přináší zvláště vysoké riziko rozvoje aterosklerózy (1).

Ovlivnitelné rizikové faktory a životní styl se odráží v širokém výskytu kardiovaskulárních onemocnění (KVO). Intenzivní působení na rizikové faktory (RF) je nutné pro zpomalení progresu onemocnění nebo navození regrese. Odstranění těchto faktorů má tedy příznivý vliv na snížení kardiovaskulární mortality a morbidity v primární a sekundární prevenci KVO. Dokázaly to výsledky studie AMORIS a především mezinárodního průzkumu INTERHEART(11).

3.3 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza byla během dlouhé doby pokládána za degenerativní postižení stěn tepen. Řídili se předpokladem že, dochází k mechanickému ukládání cholesterolu za vzniku aterosklerotických plátů, které tepnu postupně zužují a nakonec ji zcela uzavřou. V současné době je ateroskleróza považována za zánětlivé onemocnění, ve kterém buňky produkující zánětlivé mediátory (1).

3.3.1 Úloha lipoproteinů v patogenezi aterosklerózy

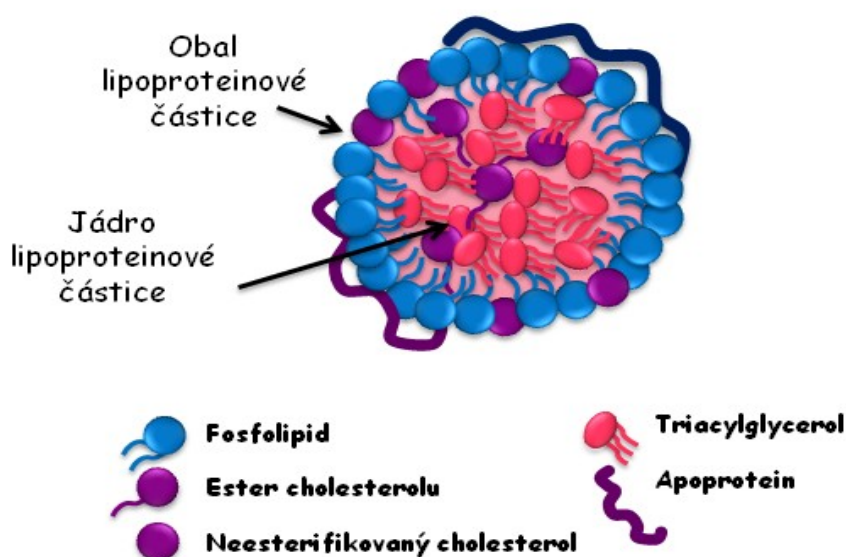
V patogenezi aterosklerózy hrají velkou úlohu lipoproteiny. Plasmatické lipidy řadíme do heterogenní skupiny látek. Jako lipidy považujeme cholesterol, triglyceridy, fosfolipidy a mastné kyseliny. Jsou to látky rozpustné v tucích a nerozpustné ve vodě. Cholesterol a fosfolipidy v organismu hrají hlavní roli ve stavbě buněčných membrán. Nejlepším energetickým substrátem a zásobou energie jsou triglyceridy, které se přeměňují v tukové tkáni na mastné kyseliny (4,8).

V organismu se vyskytuje cholesterol exogenního (potrava) a endogenního původu (syntézy je schopná každá živočišná buňka, ale v největší míře se syntéza uskutečňuje v hepatocytech, enterocytech a nervové tkáni). Je prekursorem pro syntézu žlučových kyselin. Triglyceridy (triacylglyceroly) jsou estery glycerolu a mastných kyselin. Převážně obsahují směs dvou nebo tří různých mastných kyselin. Mezi nejdůležitější fosfolipidy v plasmě řadíme fosfatidylcholin. Jsou to estery glycerolu s kyselinou fosforečnou, která se dále esterifikuje dalšími sloučeninami (cholin, serin). Mastné kyseliny se v plasmě vyskytují v esterifikované podobě a ve

formě volné, jako tzv. volné mastné kyseliny. V krvi cholesterol a triglyceridy jsou nerozpustné, pro jejich transport je potřebná jejich vazba na bílkoviny, která se nazývá apolipoprotein nebo apoprotein. Tyto sloučeniny se jmenují lipoproteiny, třídíme je dle hustoty (1,12).

- Chylomikrony (CM)
- lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL)
- lipoproteiny se střední hustotou (IDL)
- lipoproteiny nízkou hustotou (LDL)
- lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) -kardioprotektivní účinek je připisován HDL-částicím.

Obrázek č. 3: Schéma lipoproteinové částice (31).



<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Lipoprotein.png>.

Lipoproteiny jsou složeny z centrální hydrofobní složky s triglyceridy a esterifikovaným cholesterolem a hydrofilní části z fosfolipidů, volného cholesterolu a apoproteinů (viz obr. 3). Apolipoproteiny patří mezi bílkovinné sloučeniny, které váží lipidy a mají schopnost tvořit rozpustné polydisperzní částice. Mají několik důležitých funkcí (4).

- jako kofaktory enzymů účinných v lipoproteinovém metabolismu
- zajišťují vazbu lipoproteinové částice na specifické receptory
- jako strukturální bílkoviny lipoproteinových částic
- podílí se na přenosu a výměně lipidových částic mezi jednotlivými lipoproteiny

Mezi základní úkoly lipoproteinového metabolismu patří:

- vstřebávání lipidů z potravy nebo nitrobuněčná syntéza *de novo*
- transport cholesterolu a triglyceridů plasmou k cílovým orgánům, jsou dále metabolizované nebo uložené v zásobní formě
- transport cholesterolu z periferní tkáně do jater (tzv. reverzní transport cholesterolu) a jeho exkrece

Klasifikace hyperlipoproteinemie dle EAS (Evropské společnosti pro aterosklerózu):

- hypercholesterolemie
- kombinované (smíšené) hyperlipidemie
- hypertriacylglycerolemie

3.3.2 Úloha zánětu v patogenezi aterosklerózy

V patogenezi aterosklerózy hraje klíčovou roli zánět. Hlavní spouštěcí mechanismy zánětu v aterogenezi jsou:

- Oxidované lipoproteiny – LDL-částice, uložené v intimě, které prostupují do stěny tepen a navázané na proteoglykany jsou oxidativně modifikované. Kumulování těchto oxidovaných LDL-částic způsobuje aktivaci endotelií a indukují expresi adhezivních molekul, chemokinů, cytokinů a dalších mediátorů zánětu v makrofázích nebo v buňkách cévní stěny. Tyto modifikované proteiny jsou pohlcovány scavengerovými receptory monocytů a makrofágů. Makrofágy obsahující tukové kapénky nazýváme pěnové buňky. Jejich kumulace je podkladem prvních makroskopických projevů aterosklerózy, tzv. tukových proužků. Volné radikály oxidují LDL-částice, jejich aktivita převáží nad antioxidačními látkami. Pro buňky cévní stěny jsou oxidované LDL toxické a mohou narušit integritu endotelu. Částice HDL zajišťují reverzní příjem cholesterolu (z periferie do jater), působí tak antiaterogenně a taky protizánětlivě. Jsou nositeli antioxidačních enzymů,

brání tím oxidaci LDL. Nejsou ale důkazy, že artificiální podávání antioxidantních vitaminů snížilo kardiovaskulární morbiditu a mortalitu.

- Hypertenze - oboustranným pojítkem mezi hypertenzí a aterosklerózou může být zánět, jelikož se může podílet na rozvoji hypertenze. Výdej interleukinu 6 (IL-6) nebo adhezivních molekul VCAM-1 zvyšuje angiotenzin II.
- Diabetes mellitus (DM) – hyperglykémie se podílí na vzniku modifikovaných makromolekul, např. AGE (advance glycation end products), zvyšují tvorbu cytokinů v endoteliálních buňkách.
- Obezita – představuje předpoklad k inzulinové rezistenci, diabetu a diabetické dyslipidémii. Na druhou stranu se tuková tkáň sama podílí na produkci cytokinů jako TNF α (tumor necrosis faktor α) a IL-6. Účastní se samostatně na aterogenezi bez zprostředkovaného účinku přes inzulín a dyslipidémii.
- Infekce – může být významným indikátorem pro zánět, který bude příčinou aterosklerózy. Jsou často zmiňované protilátky proti Chlamyda pneumoniae, Helicobacter pylori (Hp), virus herpes simplex a cytomegalovirus jako významné predikátory vaskulárního rizika.
- Poškození endotelu – endoteliální dysfunkce a porucha endotelu jsou první fází aterosklerózy. Endotel je jednovrstevná výstelka krevních cév. Jeho hmotnost u dospělého člověka je v rozmezí 1,5-3kg. Endotel není jen buněčnou bariérou oddělující cévní stěnu od krve, ale také má metabolické a sekreční vlastnosti s celou řadou fyziologických funkcí (selektivně umožňuje transport některých látek z krve, např. lipoproteiny, inzulin. Hlavní úlohou endotelu je secernování vasodilatačních substancí označované jako EDRF (od endotelu odvozený relaxační faktor). Těmito nejdůležitějšími vazoaktivními látkami jsou oxid dusnatý (NO) a prostacyklin. NO působí vasodilatačně, inhibuje expresi adhezivních molekul, adhezi a agregaci trombocytů a apoptózu endoteliálních buněk. Dalším je endothelium-derived hyperpolarizing factor. Vazokonstrikční peptidy jsou nazývané endoteliny. Jsou to vazokonstrikční látky EDCF (od endotelu odvozený kontrakční faktor). Krátkodobě účinkuje většina těchto faktorů. Poškozené endotelie zapříchují adhezi a agregaci, ze kterých se uvolňují vazokonstrikční látky (serotonin, tromboxan) a destičkový růstový faktor PDGF. Dále endotel zasahuje do procesu reparace a angiogeneze, reguluje proces koagulace a fibrinolýzy.

Endoteliální dysfunkce je funkční postižení endotelu popsané zvýšenou propustností cévní stěny. Může k tomu dojít v důsledku působení celé řady rizikových faktorů aterosklerózy, zvláště oxidované LDL, kouření a arteriální hypertenze. Další vlivy mohou být chemické, imunitní, degenerativní, imunologické, metabolické a infekční. Porucha funkce endotelu je každopádně prvním a velmi významným stádiem (nebo prvním signálem) rozvoje aterosklerózy. Manifestaci aterosklerózy způsobují interakce genetických faktorů a zevního prostředí (4,8).

3.3.3 Úloha buněk hladké svaloviny v patogenezi aterosklerózy

Dalších fází aterogeneze se účastní i buňky hladkého svalstva. Prolifерují, migrují do subendotelového prostoru, vytvářejí mezibuněčnou hmotu (kolagen, proteoglykany, elastin), také i proteolytické enzymy, které tuto hmotu rozpouštějí a umožňují buňkám migraci. Hladkosvalové buňky zvětšují celkovou hmotu ateromu a tvorbou vaziva zpevňují aterosklerotický plát. Vznikají fibrózní pláty.

Pláty s tukovým jádrem a různě silnou vazivovou čepičkou nazýváme ateromové pláty. Podle charakteru vazivové čepičky rozlišujeme pláty stabilní (se silnou, málo buněčnou čepičkou, které jen zužují průsvit artérie) a pláty nestabilní (mají čepičku tenkou, prostoupenou četnými makrofágy, náchylnou k erozi nebo prasknutí). Tím se subendotelová tkáň nebo ateromová hmota v různém rozsahu odkryje. Zachycují se na ní krevní destičky a tvoří krevní sraženiny, protože je vysoce trombogenní. Rupturou plátu tedy dochází k trombóze (1).

Ateroskleróza je celkové onemocnění, ale aterosklerotické léze se vyskytují ve specifických místech (místa náchylná ke vzniku lézí) velkých a středních artérií. Nejčastěji poškozenými tepnami bývají koronární artérie, hrudní aorta, artéria poplitea. Z patologicko-anatomického hlediska můžeme rozdělit aterosklerózu na tři základní formy (4,8):

- Časné léze, tukové proužky.
- Fibrózní a ateromové pláty.
- Stadium komplikací, tzv. komplikované léze.

3.3.4 Základní formy aterosklerózy z patologického hlediska

1. Iniciační fáze – tvorba tukového proužku.

Tukové proužky (fatty streaks) - nejčastější a u všech přítomná forma aterosklerózy. Vyskytují se již v dětském věku a můžeme je i někdy pozorovat u novorozenců. Nacházíme je převážně ve velkých cévách, v jejich intimě. Makroskopicky jsou patrné jako žluté tečky a neprominují do lumina artérií, to znamená, že výrazně nemohou ovlivnit průtok krve. Jako základní buněčné elementy v tukových proužcích řadíme pěnové buňky, které se tvoří dvojím způsobem. Z makrofágů (ty vznikají z monocytů), které jsou chemicky atrahovány do cévní stěny, kde dochází k akumulaci lipoproteinových částic (LDL) a jejich modifikaci (oxidace a neenzymatická glykace). Nebo z buněk hladkých svalů, které se přemísťují z média do intimy. Dalšími elementy vyskytujícími i se v tukových proužcích jsou T lymfocyty (CD4, CD8) (4,8).

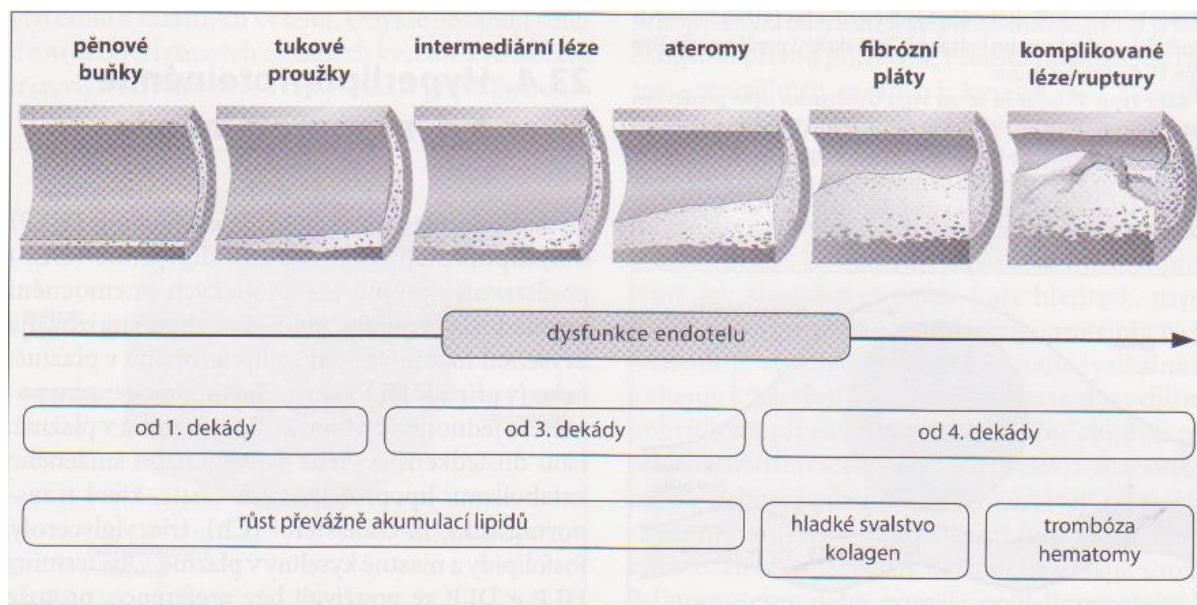
2. Progresivní fáze – tvorba aterosklerotického plátu.

Fibrózní pláty (ateromy) – větší, tužší, někdy až chrupavčité konzistence, převážně ostře zakončená ložiska ve stěně cév. Makroskopicky jsou bledě šedé, někdy žluté barvy podle obsahu tuků a prominují do lumina artérií. Dochází tedy ke ztluštění cévní stěny a vyklenutí do lumina, což je důvodem částečné nebo úplné obstrukce lumina cévy. Základními buněčnými komponenty ve fibrózních plátech jsou proliferující buňky hladkých svalů a makrofágů v různém stupni přeměny na pěnové buňky a taky lymfocyty (4,8).

3. Fáze komplikací – ruptura a trombóza plátu.

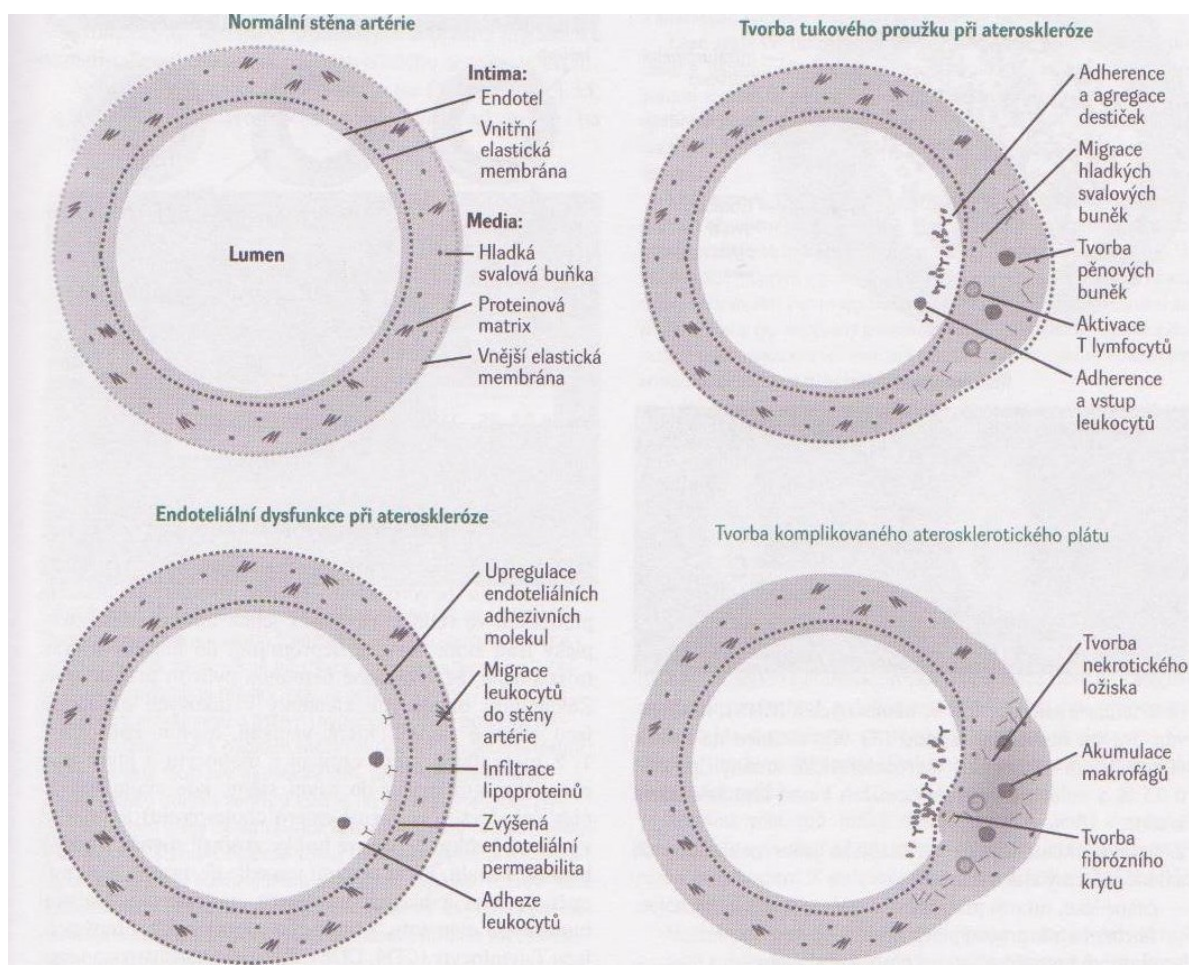
Komplikované léze – se tvoří masivní kalcifikací a degenerativními změnami (ulcerace, ruptura) fibrózních plátů. Dochází tady k adherenci trombocytů, agregaci, trombóze a organizaci trombu (8). Plát roste a uzavírá lumen cévy nebo je nestabilní a vede k náhlé trombotizaci a obstrukci. Hlubší vrstvy fibrinózního plátu vytváří nekrotické ložisko s akumulovaným cholesterolem (14,15).

Obrázek č. 4 : Vývoj aterosklerózy v čase (13).



Obr. 23.6. Fáze vývoje aterosklerózy

Obrázek č. 5: Proces aterogeneze a vývoj nestabilního a stabilního aterosklerotického plátu (4).



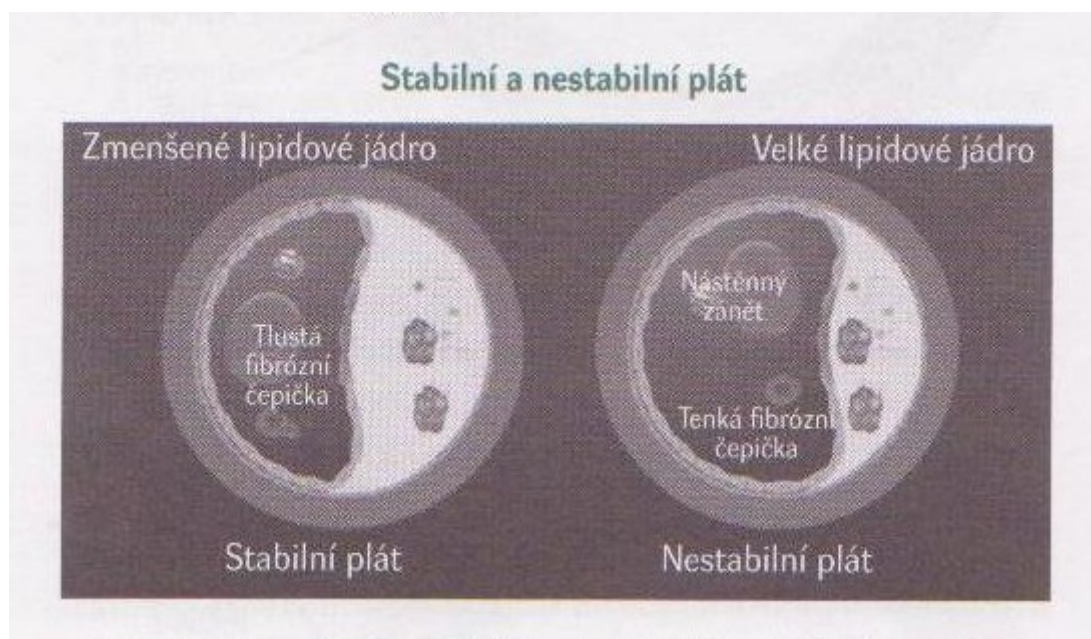
Stabilní a nestabilní aterosklerotický plát

Stabilitu plátu určuje charakter vazivové čepičky a složení extracelulární matrix.

Stabilní plát – typická je silná čepička. Je zpevněn kolagenem, elastinem a proteoglykany. Obsahuje nízký obsah tuků a nemá sklon k ruptuře.

Nestabilní (vulnerabilní) plát – charakterizován tenkou čepičkou, je bohatý na lipidy a zapříčiňuje vznik trombózy, která se pak projeví akutní cévní příhodou (1,4). Pod narušeným tenkým krytem se nachází aktivované jádro. Aktivované T-lymfocyty snižují produkci kolagenu a aktivované makrofágy vyrábí metaloproteinázy a aktivátor plazminogenu. Poté následuje degradace kolagenů, elastinu a proteoglykanů a ruptuře plátu. Dochází tedy k trombóze (12).

Obrázek č. 6: Stabilní a nestabilní plát (4).



4 ZVÍŘECÍ MODELY PRO VÝZKUM ATEROSKLERÓZY

Ateroskleróza, jako hlavní příčina úmrtí v západní společnosti, je důsledkem složitých vzájemných působení mezi genetickými a okolními faktory. Početná skupina zvířat byla používána ke studiu původu možné léčby aterosklerózy (16). První ateroskleróza se objevila již v roce 1908, když Ignatowski oznámil zesílení intimy velkých čistých buněk v aortě králíků krmených stravou bohatou na proteiny (maso, mléko, vejce) (17). Výběr nejužitečnějších zvířat byl omezen pouze na relativně velké jedince, jako například prasata a králíky. Křečci a holubi byli používáni pouze příležitostně. Krysy a psi nejsou dobrými modely pro výzkum aterosklerózy, protože potřebují těžké úpravy stravy ke způsobení vaskulárního poškození (16). Přestože králíci samovolně nevyvíjí aterosklerózou, jsou vhodnými modely, protože jsou velmi citliví na cholesterol, a přivodí si tak onemocnění ve velice krátké době (18). U králíků hladiny makrofágů a plazmy cholesterolu jsou mimořádně vysoké, což je velice rozdílné v porovnání s hodnotami u lidí. Prasata a opice více vyhovují výzkumu léčení lidského typu aterosklerózy. V současné době se již opice nepoužívají kvůli jasným důvodům: riziko vyhubení a náklady. Prase je velice vhodný model. Když je krmeno cholesterolem je aterosklerotické poškození podobné tomu lidskému. U prasat jsou však největším problémem náklady na chov. Nejvíce se proto postrádá malý, geneticky reproduktivní model pro výzkum aterosklerózy. Takový model eliminuje spoustu problémů spojených s nedostatky u větších zvířat, zejména by dovolil následné studie možných terapií, které požadují relativně velké počty zvířat (16).

4.1 Myš jako model pro výzkum aterosklerózy

Myši jsou vysoce odolné vůči ateroskleróze. Jedinou výjimkou je C57/BL/6 kmen. Pokud jsou myši krmeny stravou bohatou na cholesterol obsahující cholesterovou kyselinu, vaskulární poranění v C57/BL/6 se liší od lidského svým histologickým charakterem. Z toho důvodu se léze spíše připisují chronickému zánětlivému stádiu než genetické predispozici.

Na začátku se myš jako model pro výzkum aterosklerózy objevila v 60. letech ve Wisslerově laboratoři. Speciální strava obsahovala 30 % tuku, 5 % cholesterolu,

2 % cholové kyseliny a vedla k rozvoji aterosklerózy u těchto myší. Tato strava byla velice toxická, myši při ní ztrácely váhu a často onemocněly vážnými infekcemi dýchacího traktu (16). Nejprve Paigen a kol. stanovili tuto stravu v poměru 1:3 s 10 % tuku, ale nakonec dali přednost „Paigenově stravě” sestavené z 15% tuku, 1,25 % cholesterolu a 0,5 % kyseliny cholové(19).

Přestože to mělo své výhody, objevila se i spousta nedostatků. Poškození u myší, které měly 4 až 5 měsíců, bylo velmi malé. Poškození byla omezena na tzv. kořen aorty a obvykle byly pláty velmi malé. Strava byla také nepřirozená vzhledem k extrémně vysokému obsahu cholesterolu – 1, 25 % a přítomnosti kyseliny cholové (16). Navíc Lusiš a kol. prokázali, že taková strava je sama o sobě zánětlivá, a tedy vede k indukci jaterního poškození a projevům kritické fáze reaktantů, jako například sérum amyloidu A (20).

Myš jako model splňuje hodně kritérií, ale předně je důležité vzít na vědomí spoustu významných rozdílů mezi myší a člověkem. Průměrná délka života myši je okolo 2 let ve srovnání se zhruba 75 lety u člověka. Dospělá myš váží mnohem méně, přibližně 30 gramů. Lipidový profil u myši se velmi liší od toho lidského, který nese okolo 75 % jejich plasma cholesterolu na LDL. Myši mají většinu svých lipoproteinů cholesterolu o vysoké hustotě, o čemž je známo, že je to u lidí ochrana proti ateroskleróze. A proto myši krmeny nízkotučnou stravou nepostihne ateroskleróza, kdežto u lidí je to běžná nemoc. Rozdílná je schopnost kontrolovat prostředí a stravu myší, což je výhoda všech malých zvířecích modelů, zatímco u lidí je to z hlediska dlouhodobého výzkumu nemožné. Genetické zkoumání člověka je omezeno v míře různorodých druhů asociačních studií. Oproti tomu u myší lze provádět spoustu doplňkových druhů genetických experimentů včetně šlechtění a genetického inženýrství (16).

4.2 Apolipoprotein E

Genetické změny jsou zahrnuty v lipidovém metabolismu, včetně zakódovaného genu apolipoproteinu (ApoE). ApoE je glykoprotein s molekulární velikostí přibližně 34 kD a syntetizuje se nejen v játrech, mozku a dalších živočišných tkáních lidského organismu, ale stejně tak i v myším organismu. Jedná se o strukturální složku všech lipoproteinových částic až na lipoprotein (LDL)

s nízkou hodnotou. Jedna z jeho nejdůležitějších funkcí je sloužit jako vysoce příbuzný ligand pro apoB a apoE (LDL) receptor. Následně dovoluje, aby játra specificky vstřebávala částice obsahující apoE (23). Lidský apoE je polymorfický. Běžné genetické varianty lidského apoE, apoE-2 se liší od nejběžnější formy apoE-3 tím, že má cysteiny místo argininů. Tato náhrada aminokyseliny v LDL receptoru snižuje vazací schopnost Apo-2 na méně než 2 % ve srovnání se apoE-3. Homozygotita pro ApoE2 souvisí hyperlipoproteinémií, která je charakterizována nárůstem plasmy triglyceridů, vyšší cholesterolu a brzkým vývojem aterosklerózy. Nejen že apoE plní důležitou úlohu v lipoproteinovém metabolismu, ale je také pravděpodobné, že má další životně důležité funkce. Např. nedávné studie tvrdí, že apoE vytvořený v mozku hraje svou roli při zamezování vzniku Alzheimerovy choroby (24).

5 eNOS

Oxid dusnatý je plynň lipofilní volný radikál, který je vytvářen třemi rozdílnými izoformami syntázy oxidu dusnatého (NOS): typ č.1 neboli neuronální (nNOS), typ č.2 induktivní (iNOS), typ č.3 endoteliální (eNOS). Projevy eNOS jsou různé, protože se mění podle typu kardiovaskulárního onemocnění, jako jsou: ateroskleróza, diabetes a hypertenze.

5.1 eNOS a ateroskleróza

Patologie aterosklerózy je velmi komplexní a týká se strukturálních částic tepenní stěny, krevních destiček, leukocytů a zánětlivých buněk jako monocytů a makrofágů. Endotel tvoří dynamické propojení mezi stěnou tepny a výše zmíněnými migračními buňkami. Endoteliální dysfunkce představuje jednu z primárních příčin počátku aterosklerózy. Od té doby, co je endotel hlavním zdrojem NO v cévní soustavě, má ztráta normální buněčné funkce za následek změnu eNOS funkce a syntézy NO (25). Endotel utváří zásobu NO získanou z eNOS a za určitých podmínek, jako je zánět, může produkovat nadměrné množství NO z izoformů syntézy oxidu dusnatého nebo iNOS (26). Z toho důvodu regulace syntáz oxidu dusnatého a biodostupnost jejich produktů se stává kritickou pro vývoj a postup vaskulárních nemocí, jako je ateroskleróza. Dochází k poškození uvolňování endotelu u zvířat krmených cholesterolem, nebo u izolovaných srdečních tepen v lidském organismu, a tak poškození souvisí se stupněm aterosklerózy. Řízení L-argininu nebo tetrahydrobiopterinu snižuje progres aterosklerózy, kdežto řízení NOS inhibitorů blokuje tento ochranný účinek, což znamená, že existuje přímá spojitost mezi NO a tvořením aterosklerózy. NO se také projevil v různých *in vitro* a *in vivo* studiích pro prokázání protizánětlivých účinků. Kromě toho NO blokuje shromažďování krevních destiček a má fybrinolytické účinky. Nicméně endoteliální NO může hrát dvojí roli v ateroskleróze. Vysoké hladiny NO vytvořených z iNOS v endoteliálních buňkách a makrofázích mohou vyvolat poškození endotelu. Peroxynitrit (ONOO^-), produkt interakce mezi NO a superoxidem, může oxidovat BH₄ a snížit fyziologické úrovně potřebné k funkci eNOS. Ten se přemísťuje z tvořícího se enzymu NO do superoxidu, který produkuje enzym. Tím pádem NO

může mít buď proti, nebo pro aterosklerotické účinky založené na průběhu postupu nemoci (25).

6 SPIRULINA PLATENSIS

Spirulina je velice rychle se množící velmi jednoduchá jednobuněčná řasa žijící v teplých alkalických sladkých vodách s vyšší salinitou. Vytváří velké kolonie spirálovitého tvaru (odtud její název) (viz obr. č. 7). Patří mezi modrozelené řasy obsahující chlorofyl i modré barvivo fytocyanin. Je viditelná pouhým okem. Spirulina je bohatým zdrojem živin. Obsahuje bílkoviny s vyváženým složením aminokyselin, vysokou koncentraci vitaminů, minerálů, enzymů, sacharidů a dalších nutrietů. A taky jako jeden z mála rostlinných zdrojů obsahuje hodně vitaminu B12. Má poměrně tenkou buněčnou stěnu, proto je velmi dobře stravitelná. Její živiny jsou snadno přístupné, protože se jedná o jakýsi přechod mezi jednobuněčnými rostlinami a živočichy (28). Tato řasa vyhledává vyšší teplotu vody, ale existují i druhy adaptované na život v poušti. Ztrácejí přitom modrozelenou barvu a stávají se bílé. Příčinou toho je přeměna části jejich bílkovin na sacharidy. V Číně se uměle pěstují kvalitní druhy spiruliny. V současnosti se spirulina vyskytuje jen na několika místech na světě: v alkalických jezerech Čadském v Čadu, mexickém Texcoco, keňských Turkana a Nakuru (29).

Obrázek č. 7: Spirulina platensis pod mikroskopem



http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/prokaryotes/Oscillatoriaceae/Spirulina_2.html (30).

6.1 Živiny ve spirulině

Aminokyseliny

V buňkách spiruliny se vyskytuje velké množství ribozomů, ve kterých dochází k syntéze bílkovin. Právě to je důvod, proč jich řasy obsahují tak velké množství. Ve spirulině jsou přítomny jak aminokyseliny esenciální tak neesenciální. Z esenciálních můžeme zmínit fenylalanin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, tryptofan, valin. Alanin, arginin, cystein, glycin, histidin, kyselina aspartamová a glutamová, prolin, serin a také tyrosin patří mezi neesenciální (28).

Minerály

Spirulina se vyskytuje v alkalických vodách s vysokou koncentrací minerálních solí. Vstřebává minerály (draslík, fosfor, hořčík, mangan, selen, vápník, zinek a železo) do svého těla a vytváří z nich tzv. cheláty, organické sloučeniny aminokyselin a kovů. Obsahuje i některé vitamíny potřebné pro správný průběh metabolických procesů. Vitamín B1, B2, B3, B5 B6, B8, B12, a taky vitamín E, biotin a taky inositol, což je živina rozpustná v tucích řadící se obvykle mezi vitamíny. Podílí se na zdraví jater, detoxikaci karcinogenů, podporuje udržení ženských pohlavních hormonů a hladinu cholesterolu v krvi. Je potřebný pro správnou činnost mozku, protože spolu s cholinem vytváří surovinu pro syntézu lecitinu, který je zato zodpovědný. Je bohatým zdrojem chlorofylu, který má výrazně detoxikační a regenerační vlastnosti. Obsahuje taky významné množství beta karotenu, luteinu, který má mimořádně vysoký antioxidační potenciál, je součástí prevence degenerativních očních postižení (jako šedý zákal, makulární degenerace). Je nabitá antioxidačními enzymy, glutationem a superoxidu dismutanu, které neutralizují škodlivé účinky volných radikálů (28). Najdeme v ní i mastné kyseliny, trojici látek, kterou označujeme vitamín F (esenciální mastné kyseliny linolová, linoleová a arachidonová). Normalizují hladinu krevního cholesterolu a účastní se tvorby hormonů prostaglandinů, tím i na regulaci krevního tlaku a pružnosti cév. Omega-6 mastné kyseliny mají významný protizánětlivý efekt. Spirulina kvůli nízkému obsahu sodíku je vhodná pro osoby, které si hlídají jeho obsah v potravě (např. vysoký tlak) (29).

6.2 Vlivy spiruliny

Spirulina má příznivý vliv při jednotlivých zdravotních problémech. Mírní alergické reakce, tím že snižuje produkci histaminu. Příznivý vliv má i u diabetiků 2. typu, protože pomáhá udržovat stálou hladinu krevní glukózy a na redukci váhy. Snižuje chuť k jídlu a spotřebu inzulínu. Hojnost všech živin základních pro krvetvorbu (železa, chlorofylu, fykokyanu, bílkovin, vitaminů E, B12 a kyseliny listové) je důvodem, že spirulina má schopnost výrazně podpořit nárůst počtu červených krvinek. Působí jako imunomodulátor, tedy výrazně podporuje funkce imunitního systému, posiluje obranyschopnost organismu proti virovým onemocněním. Pomáhá zlepšit stav většiny orgánů podílejících se na imunitě: jater, kostní dřeně, mandlí, lymfatických uzlin, brzlíku a sleziny. Vylučuje z organismu díky detoxikačnímu účinku těžké kovy (olovo, kadmium, rtuť), chemické toxiny a další jedovaté látky. Regeneruje jaterní tkáň a přečišťuje krevní řečiště. Spirulina působí jako silný antioxidant (28).

Výzkumy dokazují, že hraje podstatnou roli v prevenci a léčbě nádorových onemocnění. Rovněž zlepšuje činnost imunitního systému po chemoterapii, radioterapii a celkově zlepšuje toleranci léčby. Napomáhá také odstranit chronickou zácpu a plynatost, podporuje tvorbu probiotických kultur, jako jsou *Lactobacillus* a *Bifidobakterie*. Čistí trávicí ústrojí a obnovuje zdravou střevní mikroflóru. Fykocyanin podporuje snižování toxicity v ledvinách a přispívá k ochraně ledvinových buněk (29).

Spirulina má také přínos ke snížení hladiny cholesterolu, prokázané účinky potlačit množení virů (cytomegalovirus, herpes simplex virus, viry způsobující spalničky, chřipku a příušnice. Má projektivní vliv na srdeční činnost a cévy).

Zajímavostí této řasy je možnost jak ji obohatit pomocí minerálů a stopových prvků. Organismus je umí mnohem lépe vstřebat a využít, protože jsou vázány v organických molekulách. Přínosnou kombinací je spirulina se selenem, zinkem nebo obohacená zinkem. Selen má antioxidační účinky, jeho nedostatek způsobuje předčasné stárnutí organismu i zvýšení rizika srdečně cévních chorob a nádorového bujení. Zinek plní zásadní funkci v imunitních procesech, má prospěšný vliv na hojení ran, sexualitu a plodnost i kvalitu vlasů a pokožky. Železo podporuje tvorbu krevního barviva hemoglobinu a zlepšuje přenos kyslíku krví (28).

7 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat endoteliální expresi endoteliální NO syntázy v aortě apoE-deficientních myši po 8 týdenním podávání *Spiruliny platensis*. K hodnocení exprese byly použity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci stereologické metody.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Zvířata a předepsaná dieta

Samci myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}) vážící 15-20 gramů, byly získány z Jackson Laboratories (USA). Všechny myši ve věku 3 měsíce byly poté náhodně rozděleny do 2 skupin.

Následně jim začala být podávána aterogenní dieta s obsahem 1 % cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). Ve Spirulina platensis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 40 mg Spiruliny platensis denně.

Každá z myší ve skupině krmené Spirulinou byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a byla provedena euthanasie předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

8.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na Klinice gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

8.3 Imunohistochemie

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu

a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese eNOS byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

8.3.1 Primární protilátky

Pro detekci exprese eNOS v cévní stěně jsme použili pro světelnou mikroskopii stejnou monoklonální protilátku: rabbit Anti-Mouse eNOS ve zředění 1/100 (Santa Cruz, USA).

8.3.2 Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat Anti-Rabbit EnVision (*DAKO, Carpinteria, USA*).

8.3.3 Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika).

8.3.4 Pracovní postup - *EnVision* systém

Tkáňové řezy byly přeneseny na sklíčka předem upravená v roztoku želatiny. Po oschnutí (60 minut) se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20°C. Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po patnáctiminutovém usušení se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa třicetiminutovou inkubací s 10% roztokem goat séra (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v PBS.

Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5minut) a dále do 3% H₂O₂ (15 minut).

Po oplachu v PBS (2x5minut) se řezy 30 minut inkubovaly se sekundární protilátkou anti-rabbit EnVision a opět se vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

K vizualizaci navázané protilátky se použil chromogen DAB (DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xyleny (10:1) (3 minuty), aceton-xyleny (1:10) (3 minuty) a v xyleny (3 x 2 minuty). Na závěr byla sklíčka zamontována do Eukittu.

Pracovní postup

EnVision systém – detekce exprese eNOS

- 1) sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
- 2) fixace v acetonu (-20°C; 30min)
- 3) oschnutí řezů (15min)
- 4) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 5) aplikace 10% blokujiícího zvířecího séra (30 min)
- 6) aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
- 7) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 8) promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
- 9) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 10) aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
- 11) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 12) inkubace s roztokem chromogenu (DAB)(doba inkubace různá pro každou protilátku)
- 13) oplach řezů v acetonu
- 14) odvodnění řezů (aceton)
- 15) odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
- 16) odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
- 17) odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
- 18) montování řezů do Eukittu

Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza

Plocha velikosti endoteliální exprese eNOS byla kvantifikována pomocí stereologických metod (32). Nejprve se nakrájela série 100 řezů o tloušťce 7 μm. Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 12 řez, takže osm řezů barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a eNOS barvením na cévním endotelu na jednu cévu. Odhadovaná plocha barvení se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a \cdot P,$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu Olympus AX 70 byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) pomocí softwaru NIS (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

Statistická analýza

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (střední chyba průměru) pro 8 myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena t-testem za pomoci softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, U.S.A). P hodnoty 0,05 nebo méně byly považovány za statisticky významné.

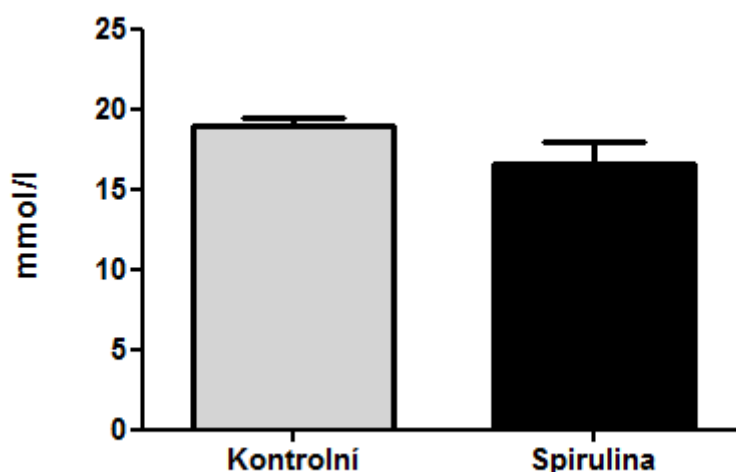
9 VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

Biochemická analýza neprokázala signifikantní změny v hladinách celkového cholesterolu u kontrolních myší ve srovnání se skupinou, které byla podávána spirulina (18.99 ± 0.5 vs 16.56 ± 1.3 , mmol/l).

Graf 1: Lipidový profil u myší kontrolních a myší krmených *Spirulinou platensis*

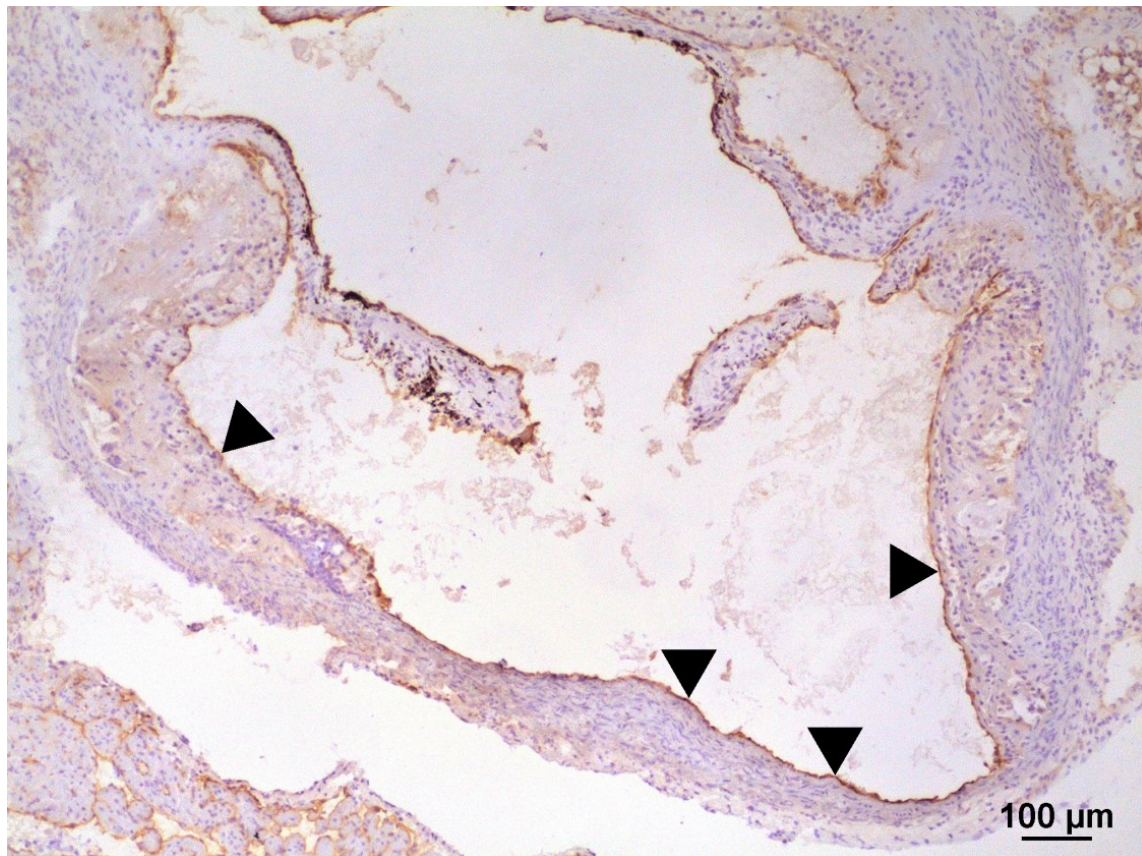
Osmítýdenní podávání Spiruliny nevedlo ke statisticky významné změně hladin celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní neléčenou skupinou ($p = 0,0983$).



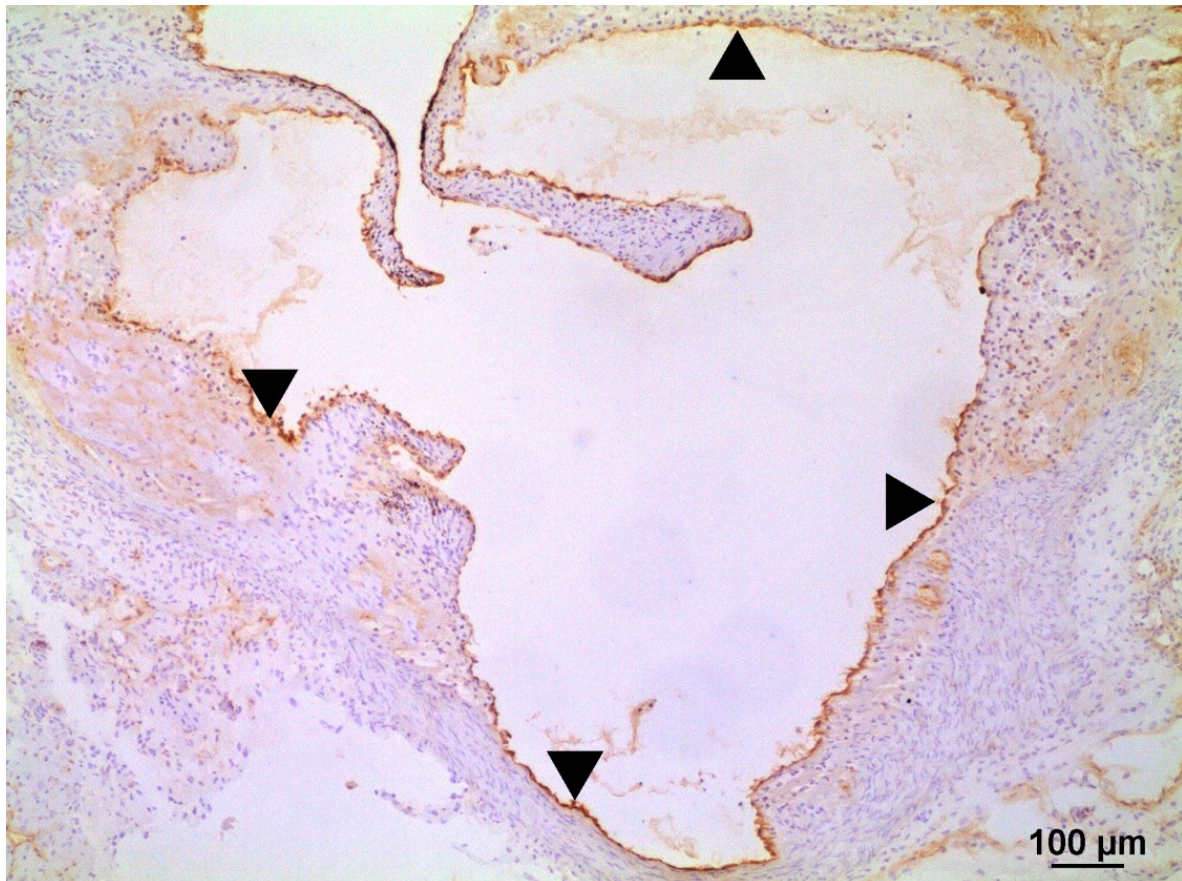
9.1.1 Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu

Výrazná exprese eNOS byla detekována u všech myší v experimentu. Exprese byla nalezena pouze na cévním endotelu plátu i mimo něj (obr č. 8). Dále byla silná exprese eNOS detekována také na srdečních chlopních v místech kořene aorty. Imunohistochemická analýza byla provedena na 120 řezech z obou skupin myší. Exprese endoteliální NO syntázy byla podobná u obou skupin zvířat a nebyly zde patrné významné změny z hlediska intenzity případně velikosti exprese.

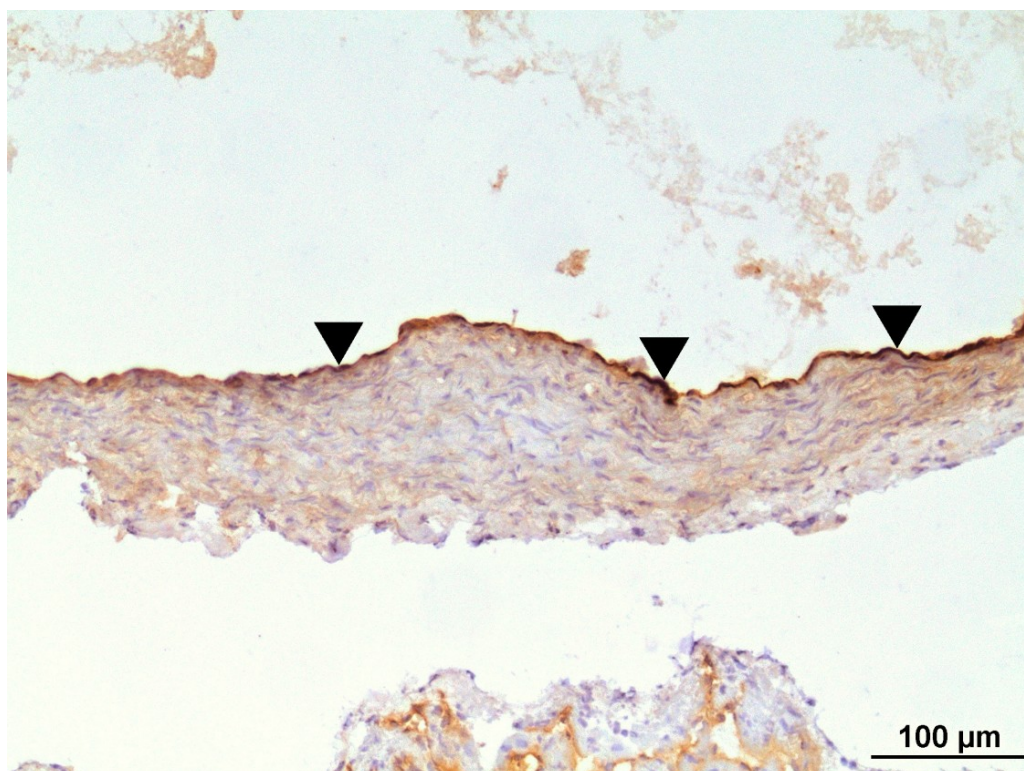
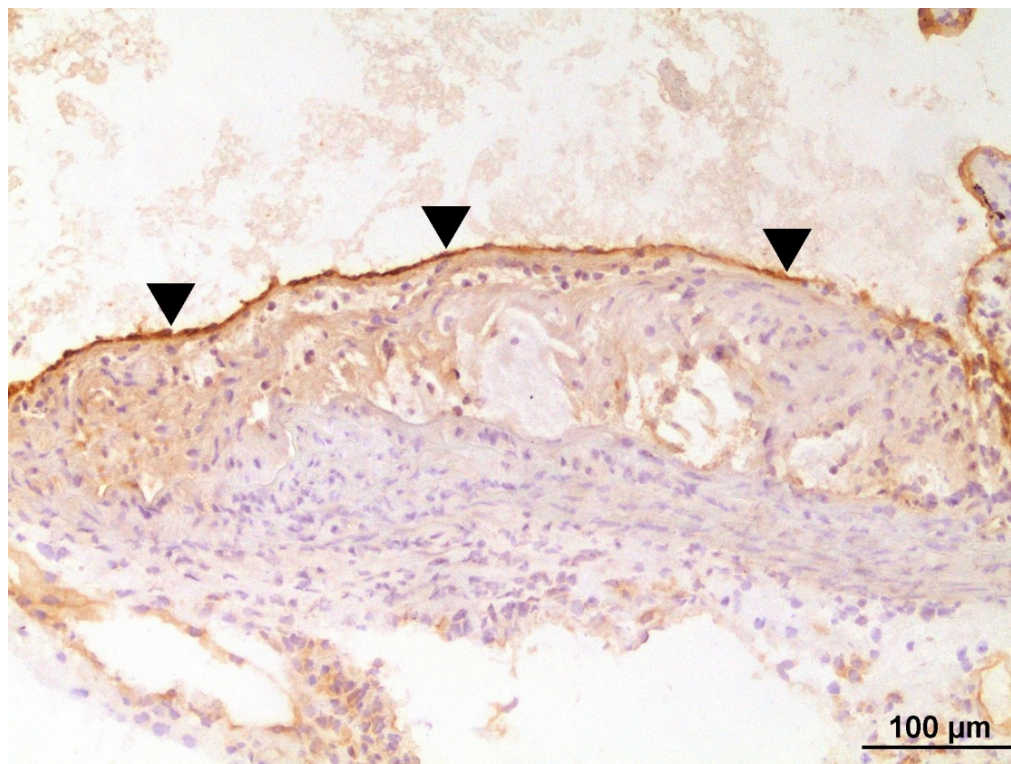
Obrázek č. 8: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS v oblasti kořene aorty u kontrolní skupiny zvířat. Exprese eNOS je detekována pouze na cévním endotelu plátu i mimo plát a na chlopních (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.



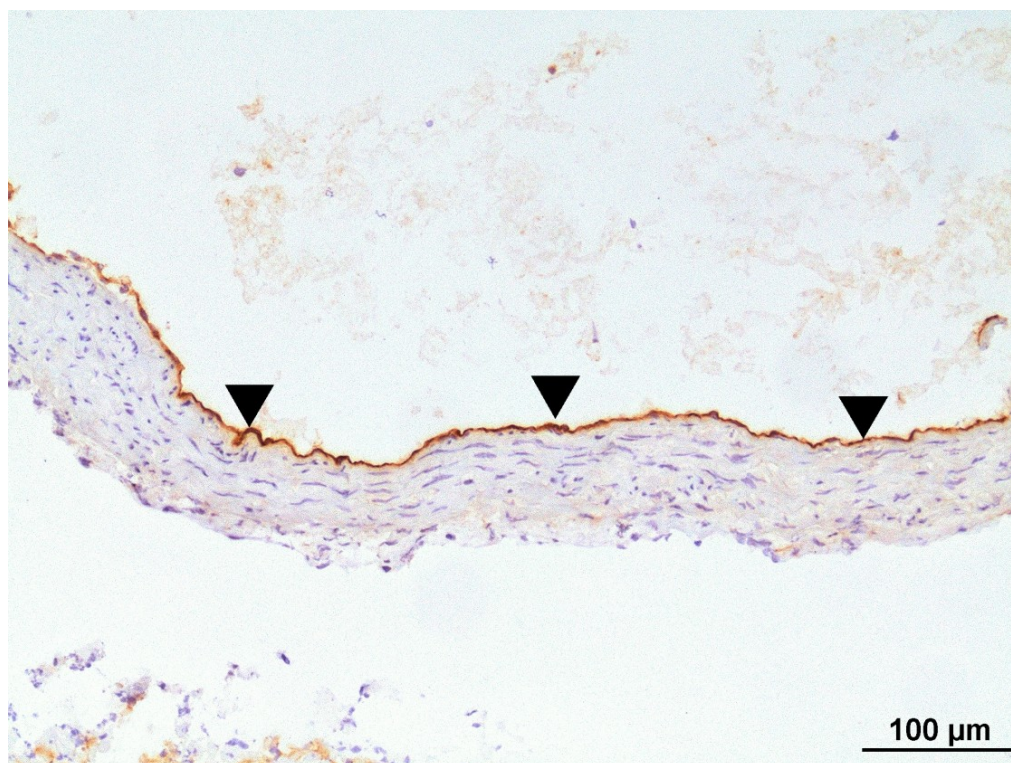
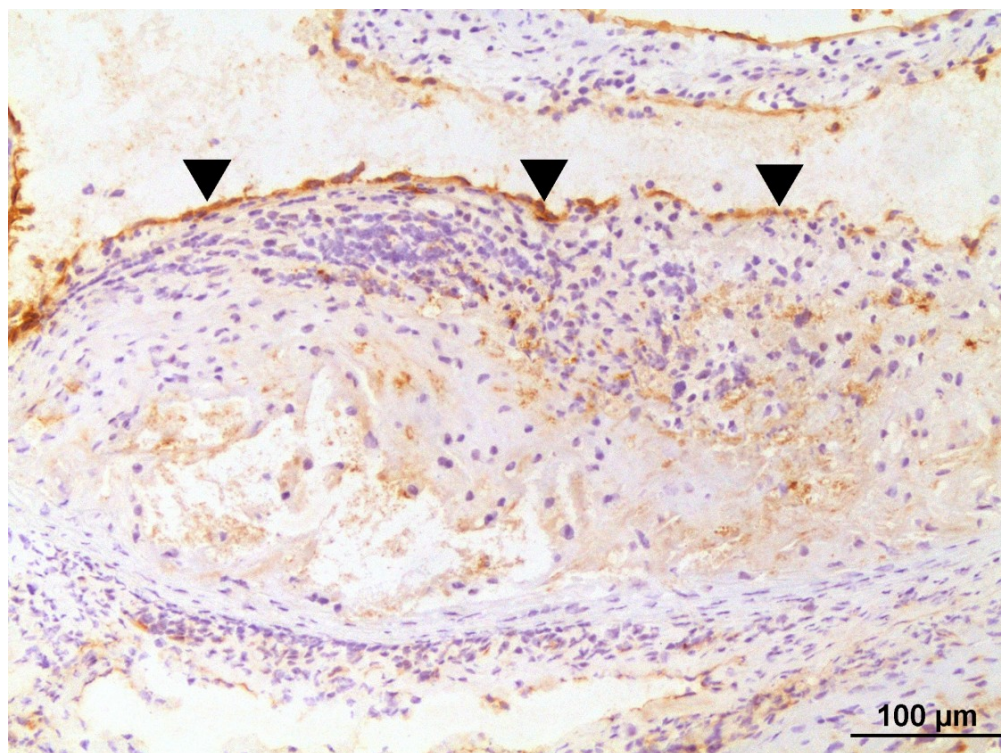
Obrázek č. 9: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS v oblasti kořene aorty u skupiny zvířat, kterým byla podávána spirulina. Exprese eNOS je detekována pouze na cévním endotelu plátu i mimo plát a na srdečních chlopních (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.



Obrázek č. 10: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS v oblasti kořene aorty u kontrolní skupiny zvířat. Šipky na obrázcích ukazují detaily exprese eNOS na povrchu aterosklerotického plátu (horní) a na intaktním endotelu (spodní). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.



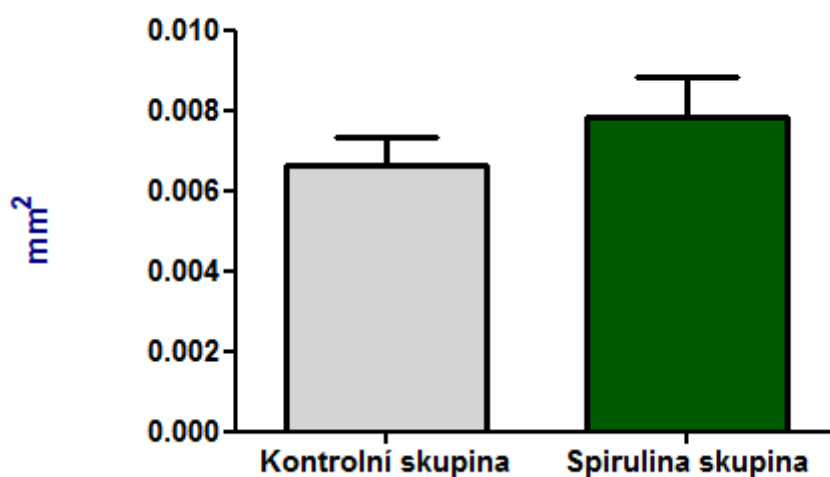
Obrázek č. 11: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení eNOS v oblasti kořene aorty u zvířat krmených spirulinou. Šipky na obrázcích ukazují detaily exprese eNOS na povrchu aterosklerotického plátu (horní) a na intaktním endotelu (spodní). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.



9.2 Stereologická analýza exprese eNOS v aortě myší

Stereologická analýza v zásadě potvrdila, že podávání *Spiruliny platensis* neovlivnilo statisticky významně endoteliální expresi eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou (0.007 ± 0.001 vs $0.007 \pm 0.001 \text{ mm}^2$) (graf 1).

Graf 1: Stereologická analýza exprese eNOS v aortě. Podávání spiruliny nevedlo k signifikantní změně exprese eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou. ($p = 0,6615$).



10 DISKUZE

Přírodní antioxidanty a jejich účinky snižují vysokou hladinu cholesterolu (hypercholesterolémií) (33). Z toho důvodu byly provedeny pokusy jak předejít nebo zabránit ateroskleróze snížením hladin cholesterolu a buněčného stresu. Spirulina se pěstuje a následně obchodně využívá po celém světě pro své výživné vlastnosti včetně vysoké koncentrace proteinů (~65%), vitamínů a minerálních solí. Přípravky s obsahem Spiruliny se pro své terapeutické účinky používají v léčbě mnoha onemocnění zahrnující hypercholesterolémií a aterosklerózu (34).

Kromě nejznámějších hypolipidemik ze skupiny statinů, jsou známy také látky, které mohou pozitivně ovlivňovat hladiny cholesterolu a případnou aterogenezi. Mezi tyto látky patří např. vláknina, jako psyllium (35), pectin, nebo celulóza (36).

Naše předchozí studie u hypercholesterolemických myší poukázaly na jisté hypolipidemické účinky spiruliny a také na jejich vliv na markery zánětu (nepublikované výsledky). V současné době jsme navíc zjistili pozitivní účinky spiruliny *in vitro* u endoteliálních buněk, včetně zvyšování exprese eNOS na úrovni Western blot analýzy (Mgr. Stráský, nepublikované výsledky).

Proto jsme v této diplomové práci studovali endoteliální expresi eNOS u apoE-deficientních myší, kterým byla podávána Spirulina platensis a to pomocí imunohistochemických metod a stereologické analýzy.

Podávání Spiruliny platensis bohužel nevedlo ke statisticky významným změnám v hladinách cholesterolu u těchto myší. Tento fakt poukazuje na možnou nízkou zvolenou dávku spiruliny nebo na krátkou dobu podávání, která by mohla být nedostačující pro snížení hladin takto vysokého cholesterolu. Protože však podávání spirulina u endoteliálních buněk zvýšilo expresi eNOS bez vlivu na hladiny cholesterolu, chtěli jsme zjistit, zda by tento efekt mohl být pozorován také na úrovni endotelu v aortě *in vivo*.

Oxid dusnatý je nejmenší známá signální molekula, která je vytvářena třemi izoformami syntázy oxidu dusnatého. Neuronální syntáza oxidu dusnatého (nNOS) se vyskytuje v neuronech a působí v centrální nervové soustavě (CNS), při regulaci krevního tlaku, uvolnění hladkého svalstva a vazodilataci prostřednictvím periferních nervů. Induktivní syntáza oxidu dusnatého (NOSII) se projevuje u mnoha typů buněk jako reakce na lipopolysacharidy a zánětlivé cytokiny. Induktivní syntáza oxidu

dusnatého (iNOS) generuje velké množství oxidu dusnatého, což má cytostatický efekt na cílové buňky (37). Induktivní syntáza oxidu dusnatého (iNOS) přispívá k patofyziologii zánětlivých onemocnění a septickému šoku. Endoteliální syntáza oxidu dusnatého NOS (eNOS, NOSIII) se nachází především v endoteliálních buňkách. Její funkcí je udržovat průchodnost krevních cest a řídit krevní tlak. Mnoho kardiovaskulárních rizikových faktorů vede k oxidačnímu stresu a endoteliální dysfunkci ve vaskulatuře (38). Z farmakologického hlediska může být vaskulární oxidační stres redukován a funkčnost eNOS obnovena reninem, angiotenzin-konvertujícím enzymem a statiny (39).

V této diplomové práci jsme našli poměrně vysokou expresi eNOS u všech myší, což bylo překvapující zjištění vzhledem k tomu, že řada studií prokázala výrazný pokles exprese eNOS během hypercholesterolémie a aterosklerózy (40, 41). Pro toto zjištění nemáme v současnosti přesné vysvětlení. Silná exprese byla pozorována v oblasti kořene aorty na cévním endotelu na povrchu plátů, i mimo pláty na intaktním endotelu. Podávání spirulina nevedlo k signifikantním změnám v expresi eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou. Toto může být dáváno do souvislosti s tím, že spirulina neovlivnila hladiny cholesterolu u těchto myší. Nepotvrdili jsme tedy ani výsledky *in vitro* analýzy.

Výsledky této diplomové práce tedy naznačují, že *Spirulina platensis* není schopna ovlivnit endoteliální expresi eNOS bez případného vlivu na hladiny cholesterolu. To zda vyšší dávka spirulina povede k pozitivním změnám na úrovni endotelu u hypercholesterolemických myší bude předmětem dalších studií.

11 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda 8 týdenní podávání *Spiruliny platensis* ovlivňuje endoteliální expresi endoteliální NO syntázy (eNOS) v aortě apoE-deficientních myší.

Podávání spiruliny nevedlo k signifikantním změnám hladin cholesterolu ve srovnání s neléčenou skupinou.

Výrazná exprese eNOS byla detekována u všech myší v experimentu. Exprese byla nalezena pouze na cévním endotelu plátu i mimo něj a dále na srdečních chlopních.

Stereologická analýza potvrdila, že podávání spiruliny *platensis* neovlivnilo statisticky významně endoteliální expresi eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou

Výsledky této diplomové práce tedy naznačují, že *Spirulina platensis* není schopna ovlivnit endoteliální expresi eNOS bez případného vlivu na hladiny cholesterolu. To zda vyšší dávka *Spirulina* povede k pozitivním změnám na úrovni endotelu u hypercholesterolemických myší bude předmětem dalších studií.

12 SEZNAM ZKRATEK

AGE	Advance glycation and products
Apo	Apolipoprotein
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE-2	Apolipoprotein E 2
ApoE-3	Apolipoprotein E 3
ApoE-4	Apolipoprotein E 4
BH4	Tetrahydrobiopterin
BMI	Index tělesné hmotnosti (body mass index)
B1	Thiamin
B2	Riboflavin
B3	Niacin
B5	Kyselina pantotenová
B6	Pyridoxin
B12	Kobalamin
C57/BL/6	Inbrední myš kmen (C57 black 6)
CD 4	Scavengerový receptor (cluster of differentiation 4)
CD 8	Scavengerový receptor (cluster of differentiation 8)
CM	Chylomikrony
CNS	Centrální nervová soustava
DAB	Diaminobenzidin
DM	Diabetes mellitus

EAS	Evropské společnosti pro aterosklerózu (European Atherosclerosis Society)
EDCF	Od endotelu odvozený kontrakční faktor
EDRF	Od endotelu odvozený relaxační faktor
eNOS	Endoteliální NO syntáza
E vitamín	Tokoferol
F vitamín	Esenciální mastné kyseliny
HDL	Lipoproteid o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
Hp	Helicobacter pylori
Hsp 90	Heat shock protein 90
IDL	Lipoprotein se střední hustotou (intermediate density lipoprotein)
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Induktivní syntáza oxidu dusnatého
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LDL	Lipoproteid o nízké hustotě (low density lipoprotein)
MSR	Receptor makrofágů
nNOS	Neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	Oxid dusnatý (nitric oxid)
NOS	Syntáza oxidu dusnatého
NOSII	Induktivní syntáza oxidu dusnatého
NOSIII	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
OCT	Medium (optimal cutting temperature)
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PDGF	Destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)

RF	Rizikový faktor
SEM	Střední chyba průměru
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
USA	Spojené Státy Americké (United States of America)
VCAM-1	Cévní adhezivní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)
VLDL	Lipoproteid s velmi nízkou hustotou (very low density lipoprotein)

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vlček J., Fialová D. a kol., *Klinická farmacie I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, s. 73-114, ISBN: 978-80-247-3169-8.
2. Navrátil L. a kol., *Vnitřní lékařství - Pro nelékařské zdravotnické obory- ICHS*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2008, s. 71-84, ISBN: 978-80-247-2319-8.
3. Vokurka M., Hugo J. a kol., *Velký lékařský slovník*, 6. vydání, Maxdorf, 2006, s. 436, ISBN: 80-7345-105-0.
4. Češka R. a kol., *Interna*, 1. vydání, Triton, 2010, s. 60-68, ISBN: 978-80-7387-423-0.
5. Paulsen D., *Histologie a buněčná biologie*, 1. vydání, Nakladatelství H&H, Vyšehradská s.r.o., 2004, s. 158-162, ISBN: 80-7319-024-9.
6. Klener P. a kol., *Vnitřní lékařství*, 4. přeprac. a dopl. Vydání, Praha: Galén: Karolinum, 2011, ISBN: 978-80-7262-705-9.
7. http://kardiosystem.websnadno.cz/rozdil_mezi_veno.jpg&w (23. 04.2012).
8. Fait T., Vrablím M., Češka R. a kol., *Preventivní medicína*, 1. vydání, Maxdorf, 2008, s.147-204, ISBN: 978-80-7345-160-8.
9. Karetová D., Staněk F. a kol., *Angiologie pro praxi*, 2. rozšířené vydání, Maxdorf, 2007, s.17-32, ISBN: 978-80-7345-001-4.
10. Glass CK., Witzum JL., *Atherosclerosis: the road acad. Cell*, 2001, 104, p. 503-506.
11. Hradec J., a Býma S., *Doporučené postupy pro praktické lékaře-Prevence kardiovaskulárních onemocnění*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, s. 1, ISBN: 978-80-86998-32-9.
12. Vojáček J., Malý M. a kol., *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, s. 33-43, ISBN: 80-247-0501-X.

13. Češka R., *Cholesterol a ateroskleróza*, Léčba hyperdemií, Praha, Maxdorf, 1999, s.226.
14. R. Rubin, Strayer D. S. et al., *Rubin's Patology*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, p.73-114, ISBN: 978-07817-9516-6.
15. Harrison's et al., *Principles of internal medicine*, 4th edition, Volume 1, International edition, 1998, p. 1345-1350, ISBN: 0-07-115268-7.
16. Jawien J., Nastalek P., Korbu K., *Mouse models of experimental atherosclerosis*, Journal of Physiology and Pharmacology, 2004, 55, p. 503-517.
17. Ignatowski AC., *Influence of animal food on the organism of rabbits*, S Peterb Izviest Imp Voyenno- Med. Akad, 1908, 16, p. 154-173.
18. Drobnik J., Dabrowski R., Szczepanowska A., Giernat L., Lorenc J., *Response of aorta connective tissue matrix to injury cause by vasopressin – Induced hypertension or hypercholestrolemia*, J Physiol Pharmacol, 2000, 51, p. 521-533.
19. Paigen B., Morrow A., Brandon C., et al, *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strain of mice*, Atherosclerosis, 1985, 57, p. 65-73.
20. Liao F., Andalibi A., deBeer F., et al, *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa- like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice*, J Clin Incest, 1993, 91, p. 2572-2579.
21. Paigen B., Morrow A., Holme PA., Mitchell D., Williams R. A., *Quantitative assesment of atherosclerotic lessions in mice*, Atheroclerosis, 1987, 68, p. 231-240.
22. Waterson RH., Lindblad-Toh K., Borneu E. et al., *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*, Nature, 2002, 420, p. 520-562.
23. Zhang SH., Reddick RL., Piedrahita JA., Maeda N., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lessions in mice lacking apolipoprotein E*, Science, 1992, 258, p. 468-471.

24. Corden EH., Saunders AM., Strittmatter WJ et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*, Science 1992, 261, p. 921-923.
25. Chatterjee A., Catravas JD., *Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation*, Vascular Pharmacology, 2008, 49, p. 134-140.
26. MacNaul KL., Hutchinson NI., *Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions*, Biochem and Biophys, 1993, 196, p. 1330.
27. Nakanuta T., Hinagata J., Imanishi T., Wada Y., Kodama T., Doi T., *HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors*, Biochem and Biophys, 2002, Res. Commun, 290, p. 858.
28. Dallen M., *Zelené potraviny: když jídlo je naším lékem*, Praha: Ratio Bona, 2010, s.65-79, ISBN: 978-80-254-4590-7.
29. Ruitang D., Chow TJ., *Hypolipodemic, Antioxydant, and Antiflammatory Activities of Microalgae Spirulina*, Cardiovascular Therapeutics, 2010, 28, p. 33-45.
30. http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/prokaryotes/Oscillatoriaceae/Spirulina_2.html. (15. 3. 2012).
31. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Lipoprotein.png>. (17. 3. 2012).
32. Nachtigal P., Semecky V., Kopecky M. et al., *Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis*, Pathol Res Pract, 2004, 200, p. 219-229.
33. Bjorkbacka H., *Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins*, Curr Opin Lipidol, 2008, 19, p. 548-549.

34. Cheong SH., Kim MY., Sok DE. et al., *Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet*, J Nutr Sci Vitaminol Tokyo 2010, 56, p. 34-40.
35. Sierra M., Garcia JJ., Fernandez N. et al., *Therapeutic effects of psyllium in type 2 diabetic patients*, Eur J Clin Nutr, 2002, 56, p. 830-842.
36. Jamborova G., Pospisilova N., Semecky V. et al., *Microdispersed Oxidized Cellulose as a novel potential substance with hypolipidemic properties*, Nutrition, 2008, 24, p. 1174-1181.
37. Nachtigal P., Kopecky M., Solichova D. et al., *The changes in the endothelial expression of cell adhesion molecules and iNOS in the vessel wall after the short-term administration of simvastatin in rabbit model of atherosclerosis*, J Pharm Pharmacol, 2005, 57, p. 197-203.
38. Sessa WC., *eNOS at a glance*, J Cell Sci, 2004, 117, p. 2427-2429.
39. Yagi S., Aihara K., Ikeda Y. et al., *Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency*, Circ Res, 2008, 102, p. 68-76.
40. Mungrue IN., Bredt DS., Stewart DJ., Husain M., *From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?*, Acta Physiol Scand 2003, 179, p. 123-135.
41. Alfon J., Guasch JF., Berrozpe M., Badimon L., *Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors*, Atherosclerosis, 1999, 145, p. 325-331.